体外診断用医薬品
製品番号 6603822

**2009 年 11 月改訂
*2007 年　2 月改訂
承認番号　21700AMY00209000

日本標準商品分類番号
877449

*T 細胞キット
サイトスタット
3A1-RD1

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

本品は、RD1（フィコエリスリン　=　PE）で標識したモノクローナル抗体試薬（溶液）です。以下の濃度の抗体タンパクを含有しています。

3A1-RD1
フィコエリスリン結合抗ヒト　CD7　マウスモノクローナル抗体　3A1
33～110μg/mL

対象抗原:
CD7（分子量 40kD）
3A1（CD7）抗体は、T　細胞系統の分化段階の最も初期の前駆細胞を含む、ほとんどの T 細胞に反応します。CD7 抗原は、複数の T 細胞株に様々な強度で発現していますが、B 細胞株での発現は認められていません。末梢血の E ロゼット形成 T 細胞の 85%が CD7 陽性です。この抗原は、胸腺に入る前の　T　前駆細胞など、T　細胞の分化段階の最も初期から発現しています。胸腺にリンパ球コロニーが形成される以前の胎児の造血細胞では、唯一の T 細胞系統マーカーとして知られています。

クローン:
3A1E-12H7
HSB 細胞（ヒト T 細胞性白血病由来）で免疫した BALB/c マウスの脾細胞とマウス NS1 ミエローマ細胞の融合細胞から分離

Ig 構造:
マウス IgG2b H 鎖及びκ L 鎖

細胞毒性:
補体依存性

原料及び精製法:
マウス腹水よりアフィニティークロマトグラフィで精製

標識:
3A1-RD1：　RD1 (Phycoerythrin = PE)
RD1／抗体タンパク比＝0.5～1.5
励起波長 486～580nm、蛍光波長 568～590nm

試薬濃度:
1 バイアル 0.5mL 中の抗体以外の各種成分の濃度

BSA	:	0.2%
リン酸カリウム	:	0.01M
NaCl	:	0.15M
NaN_3	:	0.1%
スタビライザ		

使用目的

ヒト白血病細胞（CD7 抗原陽性細胞）の分類

測定原理

フローサイトメトリーによる直接免疫蛍光法

測定には、488nm で励起し、575（568～590）nm の蛍光を検出できるフローサイトメーターを用います。

操作上の注意

1. 本品はフローサイトメトリー専用試薬です。蛍光顕微鏡には使用できません。
2. 本品は全血検体用に調製されており、新鮮または凍結保存した分離単核球検体への使用は不適当です。
3. 抗凝固剤として EDTA の他にヘパリン等も使用可能ですが、いずれを用いて採血した場合でも採血後は常温に保存し、24　時間以内に測定してください。
4. 末梢血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生残率）は　90%以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。白血病細胞などでは、保存により急激に生残率の低下を来たす場合があるため、注意が必要です。
5. 白血病検体など白血球数が　10,000　個/mm^3 を超える検体は、同一患者の血漿を用いて白血球数が　10,000　個/mm^3 以下になるように希釈してください。
6. 全血法によるサンプル処理では、赤血球の溶血残渣や溶血されなかった赤血球が誤差要因となるので、溶血操作を確実に行ってください。試験管上部壁面に付着した血液飛沫は溶血操作の前に綿棒等で除去してください。
7. タンパク濃度が異常な場合や、有核赤血球、ヘモグロビン合成異常では赤血球の溶血が不完全となることがあります。この場合、溶血していない赤血球がリンパ球としてカウントされるために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあるので注意してください。
8. 溶血時間が長いと、白血球にもダメージが及ぶ場合があります。
9. 白血病検体は、しばしば抗体タンパクの非特異的な結合が著しいため、対照には CYTO-STAT/COULTER CLONE MSIgG2b-RD1 などの陰性コントロール抗体試薬を使用してください。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良や感度及びゲートの不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. 白血病細胞など抗原の発現量に異常がみられる場合は、すべての試験管に PBS を 3mL 加えて 400～450×g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、沈渣を適量の PBS に再浮遊させてから測定すると、解析が容易になります。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用します（1 テストあたり 10μL）。

【その他必要な試薬】

1. 溶血試薬（イムノプレップ試薬システム）

製品番号 7546999　容量 300 テスト（TQ-Prep、Multi-Q-Prep 用）
製品番号 7546946　容量 100 テスト（Q-Prep 用）

イムノプレップ試薬システムは、自動サンプル処理装置専用の血・固定試薬で、以下の試薬から構成されています。

a）　イムノプレップ A（溶血試薬）
b）　イムノプレップ B（反応停止試薬）
c）　イムノプレップ C（固定試薬）

注）コールター全血ライジングキット（製品番号　6603152）など、他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って調製、使用してください。

2. PBS（リン酸緩衝生理食塩水；　溶血後に洗浄が必要な場合に使用）
PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3. 陰性コントロール試薬（アイソタイプコントロール抗体）
CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG2b-RD1（3A1-RD1 用）
製品番号 6603852　容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取と白血球数の調整】

検体には抗凝固剤（EDTA　推奨）を用いて採血した末梢血を用います。

試験管１本につき100μLの血液を用いるため、測定項目数＋対照の試験管分と検体希釈のための自己血漿採取用として、通常 1 検体につき1～2mL の血液が必要となります。

白血球数が 3～10×10^3 個/mm^3 であることが染色を行う上で望ましく、検体中の白血球数がこの範囲を外れる場合には、希釈*またはバフィーコート法などにより濃縮して白血球数を調整してください。
また、採決後の検体を保存する場合は室温（20～25℃）で保存し、できるだけ採血後 6 時間以内に操作を開始してください。

* 溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる場合は、検体の希釈や白血球数の調整には同一患者検体の血漿（自己血漿）を用いてください。

【参考: 白血球数の調整法】

a） 白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数			希釈倍数
10～20	×10^3	:	2 倍
20～30	×10^3	:	3 倍
30～40	×10^3	:	5 倍
40～60	×10^3	:	6 倍
60～100	×10^3	:	10 倍
100～200	×10^3	:	20 倍

b） 白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3 個/mm^3）

バフィーコート法
（1） 検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心します。
（2） 白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
（3） 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4） コールターLH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
（5） 自己血漿で細胞濃度を 3～10×10^3 個/mm^3 に調整します。

【操作方法】

溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる方法（Q-Prep™ 法）

注）イムノプレップ試薬システム以外の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

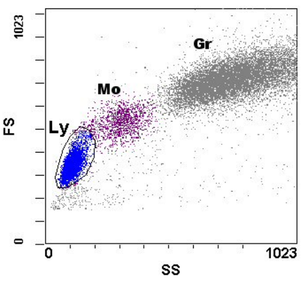
（1） テスト用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
（2） それぞれの試験管に全血を 100μL ずつ分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
（3） モノクローナル抗体試薬をテスト用の試験管に10μL加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（CYTO-STAT/COULTER CLONE MSIgG2b-RD1、別売）を 10μL 加えます。
（4） よく撹拌した後、室温で 10 分間反応させます。
（5） 試験管を TQ-Prep（または Q-Prep）で溶血・固定処理します。
  注 1） ベックマン・コールター社製フローサイトメーター以外の装置（前方散乱光を狭角で検出する装置）で測定する場合は、溶血後に脱イオン水または蒸留水を 0.5mL 加えてください。
  注 2） 白血病細胞など抗原の発現強度に異常がみられる検体を測定する場合は、【操作上の留意事項】の 11)を参照してください。
（6） フローサイトメーターでリンパ球領域または白血病細胞が分布している領域の蛍光陽性率を測定します。
（7） 調製したサンプルは、室温で 2 時間まで保存できます。2 時間を超えるときは、2～8℃で遮光保存し、調製後 24 時間以内に測定してください。

測定結果の判定方法

1. 正しく調整されたフローサイトメーターを使用してください。
2. 前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）のサイトグラム上で明瞭な白血球 3 分画（リンパ球、単球、顆粒球）が得られるように FS のスレッショルドと散乱光のゲインを確認、調整します。
3. 白血球領域全体及びリンパ球、単球など任意の白血球集団に解析ゲートを設定し、Log FL2（RD1 蛍光）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。対照用のサンプルで蛍光陽性領域を設定します。

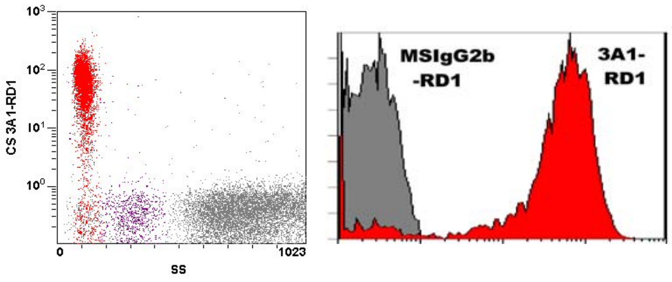
【ヒストグラム例】

本品による健常者末梢血測定ヒストグラム例
陰性コントロール抗体試薬:
CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG2b-RD1 （3A1-RD1）
フローサイトメーター: EPICS® XL™



上段: FS／SS サイトグラム
下段: サイトスタット 3A1-RD1

左図: 蛍光／SS プロット
右図: リンパ球領域（Ly）
蛍光ヒストグラム



【測定条件の確認】

健常者の末梢血などを用いて、フローサイトメーターの設定やゲーティングなどの測定条件の正確性を確認できます。
検体ごとに抗体の非特異的な結合を確認するため、適切なアイソタイプコントロール試薬（CYTO-STAT/COULTER CLONE MSIgG2b-RD1）を用います。健常者検体の場合、リンパ球領域におけるコントロール試薬の陽性率は通常 1～2%ですが、単球領域、顆粒球領域や腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

【測定結果の判定方法】

（1） 自社施設で測定した本品の正常参考値（平均値±1SD）は以下のとおりでした。

3A1-RD1 陽性率（リンパ球領域）: 78.0±5.4%　n＝20

これはあくまでも期待値の一例であり、各施設で期待値を設定してください。
（2） 正常な単球、顆粒球は CD7 陰性ですが、単球及び単球由来の白血病細胞は抗体試薬の非特異的な結合が起こりやすいので、結果の判定に注意してください。
（3） 他のマーカーの測定結果や臨床及び他の診断データにも十分留意して測定結果を判定してください。

臨床的意義

ヒト末梢血のリンパ球は T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の 3 つの細胞集団で構成されています。これらの細胞型は、顕微鏡検査による形態によって区別できませんが、細胞膜上に発現する分化成熟段階や機能的サブセットに特有な抗原を利用することによって同定することが可能です。

また、血液細胞の腫瘍である白血病／リンパ腫の細胞系統を調べるには、形態学的情報及び細胞化学染色、遺伝子再構成の検出、染色体異常の検出などとともに、細胞表面抗原の分析が非常に有用です。特に、リンパ系腫瘍の分類や、骨髄系腫瘍でも形態的な判別が困難な場合には、細胞表面抗原の分析は欠くことのできないものとなっています。

“Pan-T 細胞”抗原に特異的なモノクローナル抗体は、T 細胞の同定に用いることができます。また、リンパ球の成熟（分化）段階や機能的分類は、特定の細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて確定することができます。

Tリンパ球における“Pan-T細胞”抗原は、CD7（前胸腺細胞～）、CD2、CD5、細胞質内 CD3（未熟胸腺細胞～）、細胞表面 CD3（成熟胸腺細胞～）の順に発現していきます。これと並行して、胸腺細胞は CD1a を発現し、CD4 と CD8 の同時発現がみられ、分化成熟に伴い CD4 または CD8 のいずれかを単独発現します。

本品は、前駆細胞を含むT細胞系統全般に発現するCD7抗原を検出するもので、T細胞性の白血病の同定に有用です。バックグラウンドの蛍光強度が低く、フローサイトメトリーによる No-Wash 全血法に最適化されたモノクローナル抗体試薬です。

CD7 は、T細胞分化段階の最も初期から発現しており、T細胞性の急性リンパ性白血病（T-ALL）で発現頻度の最も高いマーカーの一つです。そ

の一方で、末梢T細胞に由来する皮膚T細胞リンパ腫や成人T細胞白血病（ATL）では CD7陰性のものがみられます。B 細胞性の腫瘍には発現しませんが、急性骨髄性白血病（AML）の一部が CD7 陽性であることが知られています。

性能

【特異性】

3A1 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD7 抗体として認定されています。
正常末梢血では、CD7 は T 細胞と NK 細胞に発現し、B 細胞、単球、顆粒球には発現しません。末梢血の E ロゼット形成 T 細胞（CD2 陽性細胞）の約 85%が CD7 陽性です。
本品は、複数の T 細胞株に反応しますが、B 細胞株には反応しません。

【同時再現性】

自社施設で、CD7 陽性率の異なる検体を本品でそれぞれ 10 回繰り返し測定したときの陽性率の変動係数（%CV）は次のとおりでした。

サイトスタット 3A1-RD1 陽性率

検体	n	平均値	SD	%CV
1	10	36.3	0.69	1.9
2	10	54.3	0.88	1.6
3	10	93.1	0.66	0.7

【相関性】

本品と自社既承認品との相関性は、以下のとおり良好でした。

末梢血リンパ球領域陽性率（%）

3A1-RD1：y＝ 0.95x ＋2.8 r＝ 0.963（n＝51）

使用上または取扱上の注意

1. 本品にはアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生しますので、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物が金属製の配水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈しながら行ってください。
2. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
3. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示、処理の後に廃棄してください。
4. ピペットを口で吸引しないでください。また、皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
5. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
6. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
7. 試薬の外観に変化が見られる、あるいはコントロール検体の測定結果に大きな変化がある場合には、試薬劣化の可能性が考えられますので使用しないでください。
   本品の正常な外観は、淡いピンク色の透明な液体です。

貯法、有効期限、安定性

1） 本品は冷蔵（2～8℃）で遮光して保存してください（凍結不可）。
2） 有効期限は、各バイアルに明記されています。

包装単位

サイトスタット 3A1-RD1
製品番号 6603822 容量 50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. Haynes BF, Martin ME, Kay HH, Kurtzberg J. 1988. Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues. J Exp Med vol. 168: 1061-1080.
2. Haynes BF, Mann DL, Hemler ME, Schroer JA, Shelhamer JH, Eisenberth GS, Strominger JL, Thomas CA, Mostowski HS, Fauci AS. 1980. Characterization of a monoclonal antibody that defines an immunoregulatory T cell subset for immunoglobulin synthesis in humans. Proc Natl Acad Sci USA vol. 77: 2914-2918.
3. Haynes BF, Denning SM, Singer KH, Kurtzberg J. 1989. Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of Human T-cell development. Immunology Today vol. 10: 87-91.
4. Pittaluga S, Raffeld M, Lipford EH, Cossman J. 1986. 3A1 (CD7) Expression precedes Tb gene rearrangements in precursor T (lymphoblastic) neoplasms. Blood vol. 68:134-139.
5. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. 1984. Leukocyte Typing. New York, NY: Springer-Verlag.

**問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー

TEL： 0120-566-730 FAX： 03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー

BECKMAN COULTER